

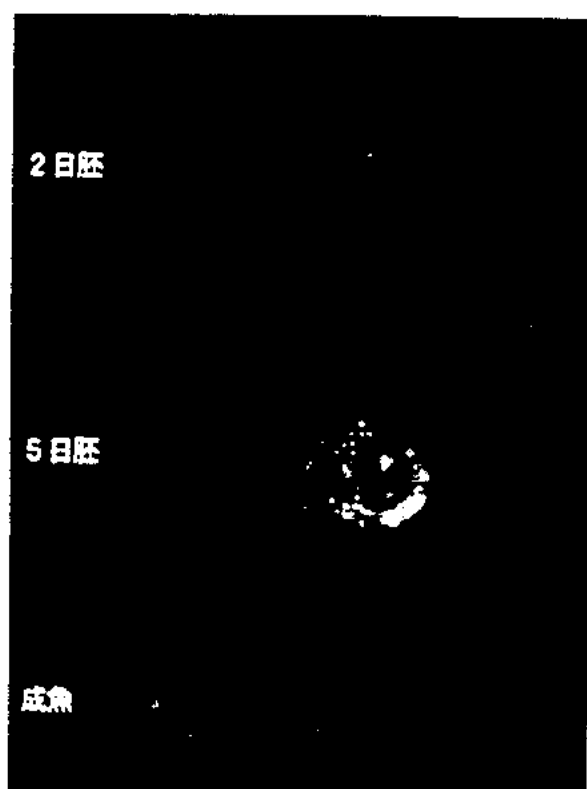
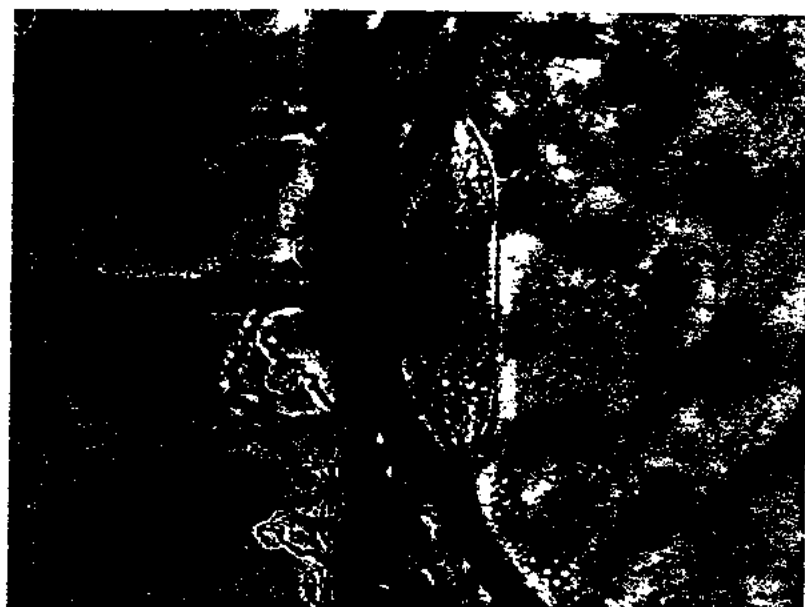


図 5. トランスジェニック・メダカの作製

(上) メダカの1細胞期の細胞質にマイクロインジェクションによって遺伝子を注入する。(下) クラゲの緑色発光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入したもの。2日胚では全身で、5日胚では頭部とレンズで、成魚ではレンズ、皮膚で、また解剖してみると内臓で緑色の蛍光が見られる。この GFP メダカはすでに系統化されている。

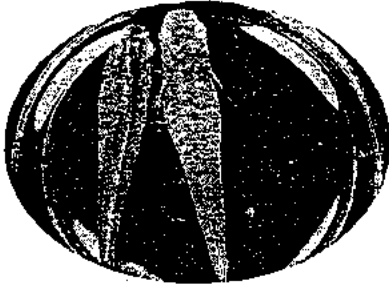
ジェニック・メダカが名古屋大学で保存されている。トランスジェニック動物の研究はゼブラフィッシュでも盛んに行われている。

水生動物で化学物質に応答して発現する遺伝子を導入したトランスジェニック動物を作るという発想は以前からある。化学物質に対する応答遺伝子を動物に導入して、その発現を GFP 遺伝子などのレポーター遺伝子で可視化するのである。このような形質転換動物を作製して水生環境における化学物質の動態をモニターすることが出来る。そのような試みの一つが1992年に京都大学の豊原らによってメダカを用いてなされた(図6)。魚類の体色は脳下垂体から分泌される黒色素細胞凝集ホルモン(MCH)によって明るくなる。この図にあるのは、サケのMCH遺伝子をウイルスのプロモーターCMVに結合した遺伝子をメダカに導入したトランスジェニック・メダカである。このトランスジェニック・メダカではMCHの過剰発現によって体色が明るくなっているのが見られる。CMVのプロモーターの代わりに化学物質応答因子のものを利用すれば、体色の明暗によって環境因子をモニターすることが出来るわけである。

今のところこの研究は実現してはいないが、同様の研究がメダカやゼブラフィッシュを用いて行われている。内分泌攪乱化学物質に応答するビテロジェニン遺伝子のプロモーターに GFP などのレポーター遺伝子を結合した遺伝子を用いてトランスジェニック・メダカを作る研究が米国で行われている。

最近、化学物質の毒性試験にトランスジェニック・メダカを用いる研究が米国で注目されている(図7、巻末6)。これまでの毒性試験では、マウスやラットが用いられてきたが、動物愛護運動が強くなっていること、標準的な試験

# メダカを利用



メダカは環境モニタリングに利用される



メダカの遺伝子導入に成功した

# 生物で環境モニター

## 泳がせて継続的に測定

環境省が、水質汚濁の指標として、メダカを利用する「メダカ環境モニタリング」を開始した。メダカは、水質汚濁の指標として、メダカを利用する「メダカ環境モニタリング」を開始した。メダカは、水質汚濁の指標として、メダカを利用する「メダカ環境モニタリング」を開始した。

メダカは、水質汚濁の指標として、メダカを利用する「メダカ環境モニタリング」を開始した。メダカは、水質汚濁の指標として、メダカを利用する「メダカ環境モニタリング」を開始した。メダカは、水質汚濁の指標として、メダカを利用する「メダカ環境モニタリング」を開始した。

## 遺伝子導入、重金属を検出

## 体色で濃度表示も

メダカは、水質汚濁の指標として、メダカを利用する「メダカ環境モニタリング」を開始した。メダカは、水質汚濁の指標として、メダカを利用する「メダカ環境モニタリング」を開始した。メダカは、水質汚濁の指標として、メダカを利用する「メダカ環境モニタリング」を開始した。

## 先端技術

図6. 環境モニターに用いるトランスジェニック・メダカの研究

1992年に京都大学の豊原治彦らによって行われた研究。実際に環境モニターとして用いるところまで研究は進んでいないが、同様の研究がメダカを用いて外国で行われている。

**AAAS MEETING**  
**BIOENGINEERING**

## Fishing for Toxic Chemicals

Many toxicologists can remember being dogged at some point by people opposed to chemical tests on animals. But when Richard Winn, a toxicologist at the University of Georgia, Athens, asked one protester how she would feel if lab mice and rats were retired in favor of fish, she answered, he recalls, "that because fish don't have faces, she would be much more comfortable." If other animal activists feel the same way, then Winn has moved a step closer to



Guinea pigs with gills? Medaka fish could supplant rodents as the animal of choice for tox labs.

### 図7. トランスジェニック・メダカを用いた化学物質試験法の開発

この種の試験には、これまではトランスジェニック・マウスが用いられてきた。動物愛護や費用などの問題から、トランスジェニック・メダカを用いた実験系の開発が米国で始まっている。鰭をもったモルモット？メダカは毒性研究でマウス等の代わりになるか？米国ジョージア大学 R. Winn らによる研究 (Science 283 775-776, 1999)

で2年の期間と100万ドルの費用がかかることが、メダカが注目される理由になっている。トランスジェニック・マウスをトランスジェニック・メダカで代替するわけである。この研究は PRISMO-10 (Tenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, Virginia 1999) 究は PTISMO-10 も発表されている。このような方向での研究は発がん物質の試験について、以前から考えられていたのであるがいよいよ本格化しそうである。

## 5) 核移植

1997年のクローン・ヒツジの誕生は社会的にも大きな衝撃を与えたが、培養細胞の核移植は哺乳動物以外の動物にとっても強力な研究基盤となる。

### i) より精巧なトランスジェニック動物の作製

これまでトランスジェニック動物の作製には卵へ遺伝子を導入する方法が用いられてきた。しかし、この方法では導入される遺伝子の数や染色体の部位を制御できないなど、いくつかの問題が生じていた。マウスでは相同組換えによって胚幹細胞 (ES 細胞) に遺伝子を導入し、その細胞から個体を作る方法が開発された (遺伝子ターゲティング)。この手法を用いると染色体上の特定の遺伝子を操作できることから、遺伝子機能を解析するための強力な武器として盛んに用いられている。しかし、マウス以外の動物では胚幹細胞の樹立が困難な

ために、この方法を応用することが出来なかった。クローン・ヒツジの研究は、ES細胞以外の培養細胞を用いても核移植の応用で精巧なトランスジェニック動物の作製が可能であることを示した。メダカを用いた核移植の研究が名古屋大学の若松らによって数年前から行われている。現在のところ胚細胞核を未受精卵に移植して胚細胞クローンを作製する段階まで進んでいる。今後は培養細胞の核移植による体細胞クローンの作製が期待されている（図8）。ゼブラフィッシュやファットヘッド・ミノーでは核移植の研究はほとんど行われていない。

ii) 系統動物や絶滅危惧種の保存への応用。

系統動物の保存は1) 生きたままの個体、2) 凍結精子、3) 凍結受精卵または胚、などによって行われている。この中で魚類で用いられているのは、1) と2) である。3) については魚類では卵黄の量が多いために成功していない。個体を生きたまま保存するのは小型魚類でも系統の数が増加すると困難になる。大型魚類ではさらに困難である。そこで精子凍結が一般に用いられているが、精子は半数体であるので、2倍体を得るためには倍数化の操作や交配が必要である。このため、元の系統の遺伝子構成を復元するにはメダカやゼブラフィッシュのような世代時間が短いものでも6ヶ月以上の期間を要する。そこで培養細胞を凍結保存しておき、その核を卵に移植する方法が考えられている。この方法では最初の世代ですでに2倍体の個体になっている。魚類では、世代時間が数年であるようなサケ・マスなどの系統保存には有効であろう。

# 胚細胞クローン法による系統保存

(ここでは黒い体色をもった純系を保存している例を示す)

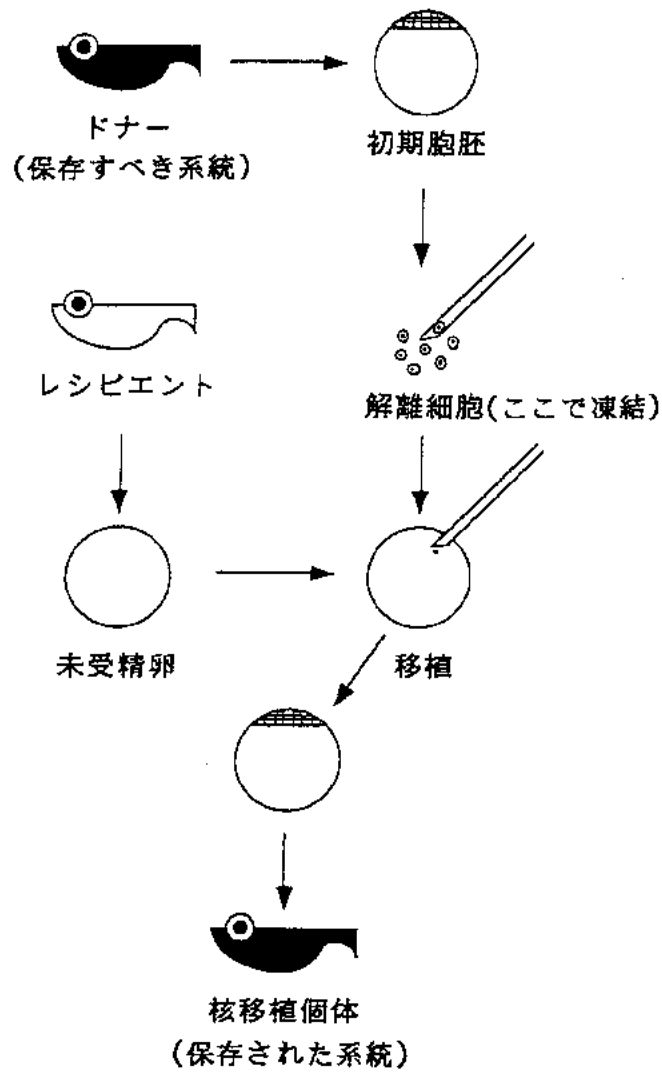


図 8. 胚細胞クローン・メダカの開発

(上) 最近話題になっているクローン法が系統保存技術としても有効であることを示している。(下) 野生型体色の胚細胞核をヒメダカに移植して作られた核移植個体(孵化直後)。

種の絶滅は基本的には生息環境の保全の問題である。メダカは絶滅危惧種とされているが広い分布域と個体数から考えて、このようなバイオテクノロジー的な手法が今すぐ必要になるとは考えられない。しかし、新潟のトキが数個体になるまでに減少した際には、細胞を凍結保存しておき近縁種卵への核移植によって復活させるという発想はあったはずである。

## 6) ゲノム研究

ゲノムプロジェクトの研究はある生物種のゲノムの全ての塩基配列を決定することを目指している。ヒトゲノムプロジェクトはやがて終了するが、これによって提供される生物・医学領域での研究基盤ははかり知れないものであることが明らかになってきた。現在、微生物や動植物で種を指定してゲノムプロジェクトの手法を応用しようとする動きが米国を中心に高まっている。この他に内分泌攪乱物質の観点から興味深いのは、メダカの性判別 DNA マーカーである。

### i) 染色体物理地図

染色体物理地図は染色体の上に DNA マーカーを設定して作製される。ゲノム研究はこのマーカーを手がかりに行われるので、多数のマーカーをもった高密度物理地図が必要になる。この点で最も研究が進んでいるのはゼブラフィッシュである。メダカの遺伝子地図の作製はゼブラフィッシュと比べると大幅に遅れている。ファットヘッド・ミノーについては資料がない。



ii) ゲノムプロジェクト

最近、米国政府は特定の生物種についてゲノムプロジェクトを開始することを決定した。ゼブラフィッシュはこのような生物種の一つとして指定された。ゼブラフィッシュのゲノム研究は国家的なプロジェクトに組み込まれることによって、加速度的に進展することが期待される。次のような予算申請がNIH(国立衛生研究所)に対してなされている。3年の予定で、年間11億円、総額32億円である。ゼブラフィッシュの研究基盤の強固さがうかがわれる数字である。

表3. ゼブラフィッシュ・ゲノム研究予算要求書

| 項目      | 年当たり(万円) | 期間(年) | 合計(万円)  |
|---------|----------|-------|---------|
| ESTs    | 19,800   | 3     | 59,400  |
| 系統保存    | 3,000    | 3     | 9,000   |
| データベース  | 12,000   | 3     | 36,000  |
| 突然変異地図  | 4,000    | 3     | 12,000  |
| 染色体物理地図 | 16,800   | 3     | 50,400  |
| 塩基配列決定  | 54,000   | 3     | 162,000 |
| 合計      | 109,600  | 3     | 328,800 |

### iii) 性判別 DNA マーカー

体色による遺伝的性の判別では d-rR 系統で 0.3%、FLF 系統では 4% の誤差がでる。新潟大学の松田、酒泉らは、Y 染色体上にある雄決定遺伝子に対して赤色素細胞や白色素細胞の遺伝子よりさらに近い所に位置する DNA マーカーを見い出した。これを用いれば遺伝的性の判別をより正確に行うことができる。図 9 は、このマーカーを用いて FLF メダカの遺伝的性を PCR によって調べたものである。PCR のバンドは白色素細胞を持った雄で 2 本、持たない雌で 1 本見られる。雄に余分に見られる 1 本のバンドが Y 染色体マーカーである。この実験では体色および第二性徴から判別された性と DNA マーカーによって判別した性が一致していることが分かる。この DNA マーカーを利用すると、X 染色体と Y 染色体の交差によって体色と性が一致していない個体でも、遺伝的性を正しく判断できる。このように性の判別に利用できる DNA マーカーはファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュには存在しない。

### 7) データベース

メダカでは名古屋大学の堀による Medakafish Homepage が、ゼブラフィッシュではオレゴン大学の Westerfield らによる The Fish Net がある（巻末別刷）。ファットヘッド・ミノーではメリーランド大学の Yonkos らによる Atlas of Fathead Minnow Normal Histology がある。

また英文誌 Fish Biology Journal MEDAKA が名古屋大学生物分子応答研究



図 9. DNA マーカーによる遺伝的雌雄の判定

雄ではバンドが 2 本、雌ではバンドが 1 本見られる (FLF 系統)。

センターで刊行されている（巻末資料7）。

## 8) 環境因子試験法の標準化

### i) 政府・大学によるもの

化学物質に対する標準試験法についてはファットヘッド・ミノーで早くから開発が進んでいる。急性毒性試験（米国環境保護局、1993）、慢性毒性試験（米国環境保護局、1994）、稚魚成長試験（ASTM、1993）、全生涯試験（Benoit、1981）などである。内分泌攪乱化学物質についても米国環境保護局はファットヘッド・ミノーを用いて標準的な試験法を開発したと伝えられている。詳細についての資料はないが、雄個体でのビテロジェニンの測定を中心にしたものと言われている。メダカとゼブラフィッシュにはこのようなものはない。

### ii) 企業によるもの

米国の Marinc Bioassay Labortory という企業がファットヘッド・ミノーを用いた水質検査キットを開発中であるとしている。この会社はミジンコを用いた水質検査キットをすでに市販している（巻末資料）。メダカでは住友テクノスが d-rR 系統を用いて内分泌攪乱化学物質の試験法を開発している。

## 8) まとめ

i) わが国におけるメダカの研究は歴史的に 1900 年の初め頃までさかのぼる。ファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュと比べても最も長い研究の

歴史をもっている。それだけに系統動物など研究基盤の蓄積も豊富である。とくに生殖に関する研究の蓄積は内分泌攪乱化学物質の調査には絶好の研究基盤となろう。しかし、これらの研究基盤は、巧妙で精巧ではあるけれども個人の名人芸的な努力に負っているところが多い。いわば手工業的なレベルのものである。系統保存体制などに見られるように、予算、人員、施設を要するものについてはまことに貧弱である。この点でファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュと対照的である。

ii) ファットヘッド・ミノーについては、環境因子の研究に集中して研究基盤が形成されている。これによって、米国はファットヘッド・ミノーを基軸にして、環境因子研究の体制と各種の標準試験法を世界に先駆けて確立することができた。

iii) ゼブラフィッシュは実験動物として広く用いられるようになったのは、ごく最近、20年ほどのことである。ゼブラフィッシュは、大量突然変異の集積など、現代の分子生物学の手法を体系的かつ大規模に導入することによって、基礎生物学の分野で、確固たる研究基盤を短期間の間に整備することが出来た。

## 5. メダカの絶滅と生態学

動物の絶滅はその動物に特有の生息環境が維持されているかどうかに関わっている。メダカの学名は Oryzias latipes であるが、Oryzias には稲という意味が含まれている。英語では rice fish, 中国語では稻田魚と呼ばれている。これはメダカが水田地帯に生息していることを意味する。50年前の日本の典型的な田園風景とは畦道で囲まれた水田があり、用水路の小川があり、小さな森に囲まれた農家が散在し、近くには薪を取りに行く里山がある、と言ったものである。これがメダカが生息してきた環境である。メダカの減少については水質汚染や農業技術の近代化による水田とその周辺の環境の変化に原因が求められている。例えば「メダカが消えて見えるもの」（富山和子、日経夕刊、1999年3月9日）、「水田にメダカと子供の歓声戻せ」（小澤祥司、朝日、1999年3月16日）、「メダカを呼び戻そう 新しい農政」（朝日、社説、1999年4月21日）などの意見である。

NHK は「クローズアップ現代」の番組で「メダカの学校、もう見られない」（1999年3月29日）を同様な基調で放送した（巻末資料9）。しかし、これらの論調は必ずしも科学的に裏づけられているわけではない。先に述べた文献調査で気になるのはメダカの生態に関する研究論文がほとんど存在しないことである。これはメダカが余りにも身近すぎて研究対象としては平凡すぎるためなのか。不思議なことである。

メダカの減少と内分泌攪乱化学物質の関係については野外調査によるデータの報告がほとんど無い。これは今後の課題であろう。

## 6. 文化としてのメダカ

メダカはわが国において絶大な文化的背景をもっている。例えば朝日新聞では1985年から1999年の5月末までに210件のメダカについての記事が掲載されている。朝日一紙でこれだけであるから、他の主要紙と地方紙を合わせれば、その数は膨大な数になるはずである。その多くは、学校、地域や自治体、市民グループ（NGO）などによるメダカの飼育や保存をめぐる活動を伝えたものである。このような活動はインターネットを通じても大きく広がっている。メダカについてのホーム・ページはちょっと調べただけでも20程度にはなる。メダカの生命と成育、生息地域、環境保全、絶滅などについての多くの観察、調査、体験、提言などが含まれている。

メダカは学校教育においても最もよく使われている理科教材である。名古屋市の東山動物園にはメダカだけの「世界のメダカ館」がある。文化において国民的基盤をもっている点ではファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュはメダカとは比べるべくもない。

メダカの絶滅を考えるときに、学校、地域、自治体、市民グループ（NGO）の活動は保存への大きな力となるはずである。例えば1999年3月には「神奈川メダカサミット」が水族館、藤沢メダカの学校を作る会とそのPTA、県水産試験所、藤沢市、日本大学などの協力で開かれ、「メダカ宣言」も発表されている（巻末資料10）。これらの個人や団体の自主的な活動とどのように